

8/7/1

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013123684 **Image available**

WPI Acc No: 2000-295555/200026

Medical agent for inhibiting production of matrix metalloprotease or its precursor, - contains polyalkoxyflavonoid compound, such as nobiletin or tangeretin

Patent Assignee: NORINSUISANSO KAJU SHIKENBACHO (NORQ); NORINSUISANSO KAJU SHIKENJOCHO (NORQ)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 3010210	B1	20000221	JP 98248145	A	19980902	200026 B
JP 2000080035	A	20000321	JP 98248145	A	19980902	200026

Priority Applications (No Type Date): JP 98248145 A 19980902

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 3010210	B1		11	A61K-031/352	
JP 2000080035	A		12	A61K-031/35	

Abstract (Basic): JP 3010210 B

NOVELTY - A medical agent for inhibiting the production of the matrix metalloprotease or its precursor, contains a polyalkoxyflavonoid. DETAILED DESCRIPTION - A medical agent for inhibiting the production of the matrix metalloprotease or its precursor, contains a polyalkoxyflavonoid of formula (I) R1 = hydrogen or 1-6C alkyl; R2-4 = hydrogen or 1-6C alkoxy; R5 = 1-6C alkyl.

USE - Used in the prevention and/or treatment of matrix metalloprotease-related illnesses, such as chronic rheumatism, osteoarthritis, cancer, arteriosclerosis, aneurysm, cirrhosis, ulcers, osteoporosis, pulmonary fibrosis, glomerulonephritis and peridental inflammation.

ADVANTAGE - Production of matrix metalloprotease can be inhibited.
Dwg.0/8

Derwent Class: B02

International Patent Class (Main): A61K-031/35; A61K-031/352

International Patent Class (Additional): A23L-001/30; A61K-035/78;

A61P-001/02; A61P-001/04; A61P-001/16; A61P-009/10; A61P-009/14;

A61P-011/00; A61P-013/12; A61P-019/04; A61P-019/10; A61P-035/04;

A61P-043/00; C07D-311/30; C07D-311/32

BEST AVAILABLE COPY

ATTORNEY DOCKET NUMBER:11592-006-999

SERIAL NUMBER: 10/088,664

REFERENCE: B15

8/7/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

013123684 **Image available**

WPI Acc No: 2000-295555/200026

Medical agent for inhibiting production of matrix metalloprotease or its precursor, - contains polyalkoxyflavonoid compound, such as nobiletin or tangeretin

Patent Assignee: NORINSUISANSHO KAJU SHIKENBACHO (NORQ); NORINSUISANSHO KAJU SHIKENJOCHO (NORQ)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 3010210	B1	20000221	JP 98248145	A	19980902	200026 B
JP 2000080035	A	20000321	JP 98248145	A	19980902	200026

Priority Applications (No Type Date): JP 98248145 A 19980902

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 3010210	B1		11	A61K-031/352	
JP 2000080035	A		12	A61K-031/35	

Abstract (Basic): JP 3010210 B

NOVELTY - A medical agent for inhibiting the production of the matrix metalloprotease or its precursor, contains a polyalkoxyflavonoid. DETAILED DESCRIPTION - A medical agent for inhibiting the production of the matrix metalloprotease or its precursor, contains a polyalkoxyflavonoid of formula (I) R1 = hydrogen or 1-6C alkyl; R2-4 = hydrogen or 1-6C alkoxy; R5 = 1-6C alkyl.

USE - Used in the prevention and/or treatment of matrix metalloprotease-related illnesses, such as chronic rheumatism, osteoarthritis, cancer, arteriosclerosis, aneurysm, cirrhosis, ulcers, osteoporosis, pulmonary fibrosis, glomerulonephritis and peridental inflammation.

ADVANTAGE - Production of matrix metalloprotease can be inhibited.
Dwg.0/8

Derwent Class: B02

International Patent Class (Main): A61K-031/35; A61K-031/352

International Patent Class (Additional): A23L-001/30; A61K-035/78;

A61P-001/02; A61P-001/04; A61P-001/16; A61P-009/10; A61P-009/14;

A61P-011/00; A61P-013/12; A61P-019/04; A61P-019/10; A61P-035/04;

A61P-043/00; C07D-311/30; C07D-311/32

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-80035

(P2000-80035A)

(43) 公開日 平成12年3月21日 (2000.3.21)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)	
A 6 1 K 31/35	A E D	A 6 1 K 31/35	A E D	4 B 0 1 8
	A B G		A B G	4 C 0 6 2
	A B J		A B J	4 C 0 8 6
	A B X		A B X	4 C 0 8 8
	A C D		A C D	

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-248145

(22) 出願日 平成10年9月2日 (1998.9.2)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年3月5日
日本薬学会第118年会組織委員会発行の「日本薬学会第
118年会講演要旨集1」に発表

(71) 出願人 591025303

農林水産省果樹試験場長

茨城県つくば市藤本2-1

(72) 発明者 矢野 昌充

静岡県清水市興津本町318

(72) 発明者 小川 一紀

静岡県清水市小鹿3-3-2

(72) 発明者 吉田 俊雄

静岡県清水市興津本町318

(72) 発明者 根角 博久

静岡県清水市興津本町318

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マトリックスメタロプロテアーゼ産生阻害剤

(57) 【要約】

【解決手段】 フラボノイドを含有する、マトリックスメタロプロテアーゼまたはその前駆体の産生を阻害するための薬剤。

【効果】 フラボノイドを利用することにより、マトリックスメタロプロテアーゼまたはその前駆体の産生を阻害することができる。従って、フラボノイドを投与することにより、マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患を予防および/または治療することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 フラボノイドを含有する、マトリックスメタロプロテアーゼまたはその前駆体の産生を阻害するための薬剤。

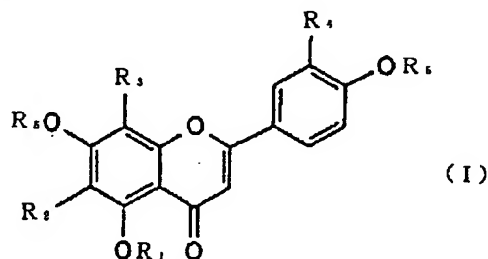
【請求項2】 フラボノイドが柑橘類に由来する請求項1記載の薬剤。

【請求項3】 柑橘類がミカン区に属するシイクワシャー (*Citrus depressa*)、タチバナ (*C. tachibana*)、コウジ (*C. leiocarpa*)、ギリミカン (*C. tardiva*)、ジミカン (*C. succosa*)、シカイカン、キシウ (*C. kinokuni*)、コベニミカン (*C. erythrosa*)、スンキ (*C. sunki*)、チチウカイマンダリン (*C. deliciosa*)、キング (*C. nobilis*)、ボンカン (*C. reticulata*)、ダンシータンジェリン (*C. tangerina*)、ユズ区に属するハナユ (*C. hanayu*)、コウライタチバナ (*C. nipponica*) からなる群より選択される請求項2記載の薬剤。

【請求項4】 フラボノイドがポリアルコキシフラボノイドである請求項1記載の薬剤。

【請求項5】 ポリアルコキシフラボノイドが下記の一般式 (I) で表される化合物である請求項4記載の薬剤。

【化1】

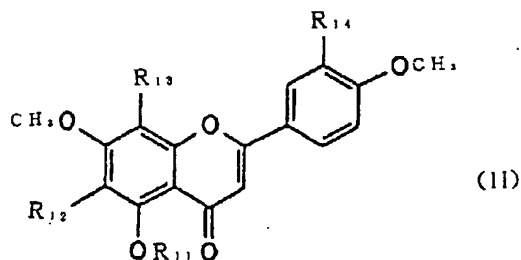


(式中、 R_1 は水素原子または炭素数1～6の低級アルキル基を表し、 R_2 、 R_3 および R_4 は各々独立に水素原子または炭素数1～6のアルコキシ基を表し、 R_5 は炭素数1～6の低級アルキル基を表す。)

【請求項6】 フラボノイドがポリメトキシフラボノイドである請求項1記載の薬剤。

【請求項7】 ポリメトキシフラボノイドが下記の一般式 (II) で表される化合物である請求項6記載の薬剤。

【化2】



(式中、 R_{11} は水素原子またはメチル基を表し、 R_{12} 、 R_{13} および R_{14} は各々独立に水素原子またはメトキシ基を表す。)

【請求項8】 一般式 (I) で表される化合物が、5-デメチルノビレチン、タンゲレチン、ノビレチン、8-デメトキシノビレチン、6-デメトキシタンゲレチンおよび6-デメトキシノビレチンからなる群より選択される請求項7記載の薬剤。

【請求項9】 マトリックスメタロプロテアーゼまたはその前駆体が、コラゲナーゼ群の酵素、ゼラチナーゼ群の酵素、ストロムライシン群の酵素、膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ群の酵素、マトリライシン、メタロエラスターゼ、およびそれらの前駆体からなる群より選択される請求項1記載の薬剤。

【請求項10】 マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患の予防および/または治療薬として使用する請求項1記載の薬剤。

【請求項11】 マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患が、慢性関節リウマチ、変形性関節症、がん、動脈硬化症、動脈瘤、肝硬変、潰瘍、骨粗鬆症、肺線維症、糸球体腎炎、歯周炎からなる群より選択される請求項10記載の薬剤。

【請求項12】 請求項1～11のいずれかに記載の薬剤が添加されている食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、マトリックスメタロプロテアーゼ産生阻害剤に関し、より詳細には、フラボノイドを含有する、マトリックスメタロプロテアーゼまたはその前駆体の産生を阻害するための薬剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 関節軟骨の主な機能は負荷の均等化および運動時の低摩擦化である。その機能の維持には軟骨細胞由来の細胞外マトリックスが重要であり、その組成は軟骨コラーゲンとプロテオグリカンを主成分とする。軟骨コラーゲンはおもにII型より構成され、これに加えて微量成分としてのIX、XおよびXI型があるが、これらのうちXI型はコラーゲンの網目構造の形成や安定化に重要な役割を担うと考えられている。一方、プロテオグリカンの最も典型的なものは軟骨型プロテオグリカンと呼ばれるもので、コンドロイチン硫酸およびケラタン硫酸などが糖を介してコアプロテインに結合し、さらにコアプロテインはヒアルロン酸にリンクプロテインを介し非共有結合した分子量250万以上の巨大分子を形成している。また、軟骨ではコラーゲンの80%以上を占めるII型コラーゲンが網目状の構造をとり、この網目を埋めるようにヒアルロン酸とプロテオグリカンが存在し軟骨マトリックスを形成している。

【0003】 これらのマトリックス成分の破壊を伴う疾患として、原因および発生機序の詳細が未だ不明な慢性関節リウマチ(RA)や加齢と共に発症頻度の増加する変形性関節症(OA)などが知られている。軟骨破壊をもたらす

のは軟骨マトリックスを分解するプロテアーゼであり、なかでも中性に至適pHをもつマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)が重要な役割を果たすとされている。事実、実験的関節炎モデルやRAおよびOAの滑膜や軟骨中には、MMPの局在が確認されている。通常MMP産生組織にはこのMMPと特異的に結合し不活性化する組織性メタロプロテアーゼインヒビター(TIMP)が存在し、細胞外マトリックスの分解を調節しているが、RAおよびOAではMMPとTIMPの発現に大きな差があり、その不均衡により関節軟骨破壊が亢進するとされている。このMMP産生の亢進は、主に滑液中に存在する炎症性サイトカインであるインターロイキン1(IL-1)や腫瘍壊死因子(TNF α)により誘発されると理解されている。従って、MMP産生を阻害することにより、RAやOAを予防および治療することができると考えられる。これまでのところ、MMP産生を阻害する物質としてはデキサメタゾンが知られているが、この化合物は誘発感染症、続発性副腎皮質機能不全や消化性潰瘍などの副作用が強く、軟骨マトリックス成分の破壊を伴う疾患の予防および/または治療薬としては使用されていない。

【0004】MMPはその構造および基質特異性の違いから、1) コラゲナーゼ群(MMP-1,-8および-13)、2)ゼラチナーゼ群(MMP-2および-9)、3) ストロムライシン群(MMP-3および-10)、4) 膜結合型MMP(MMP-14,-15,-16および-17)、5) その他(MMP-7,-11,および-12)の5つのグループに分類される。これらの酵素は着床、発生・形態形成、ガン細胞の転移・浸潤、RAやOAなどにおいて細胞外マトリックス分解の面から密接に関わることが認められている。これらMMPのうちその基質特異性の違いなどから1、2および3群の酵素がOAやRAにおいて骨破壊ひいては関節の機能損失をもたらすとされている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、マトリックスメタロプロテアーゼの産生を阻害する薬剤を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、フラボノイドが関節破壊疾患に関与する炎症性サイトカインであるインターロイキン1のマトリックスメタロプロテアーゼ類の誘導を阻害することを見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、フラボノイドを含む、マトリックスメタロプロテアーゼまたはその前駆体の産生を阻害するための薬剤を提供する。本発明の薬剤は、マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患の予防および/または治療薬として利用できる。また、本発明は、上記の薬剤が添加されている食品も提供する。

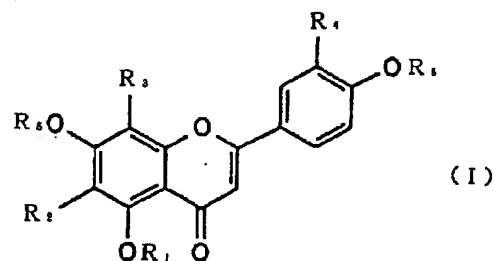
【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明のマトリックスメタロプロテアーゼまたはその前駆体の産生を阻害するための薬剤はフラボノイドを含む

する。フラボノイドは柑橘類に由来するものであるとい。柑橘類に由来するフラボノイドは他の植物に由来するものとは著しく異なる特徴を有する。その特徴の一つは他の植物にはないポリメトキシフラボノイド(PMFs)を含むことである。柑橘類は、柑橘類がミカン区に属するシイクワシャー (*Citrus depressa*)、タチバナ (*C. tachibana*)、コウジ (*C. leiocarpa*)、ギリミカン (*C. tardiva*)、ジミカン (*C. succosa*)、シカイカン、キシウ (*C. kinokuni*)、コベニミカン (*C. erythrosa*)、スンキ (*C. sunki*)、チチウカイマングリン (*C. deliciosa*)、キング (*C. nobilis*)、ボンカン (*C. reticulata*)、ダンシータンジェリン (*C. tangerina*)、ユズ区に属するハナユ (*C. hanayu*)、コウライタチバナ (*C. nippokoreana*) からなる群より選択することができる。フラボノイドはポリアルコキシフラボノイドであるとしてよく、好ましくは、下記の一般式(I)で表される化合物である。

【0008】

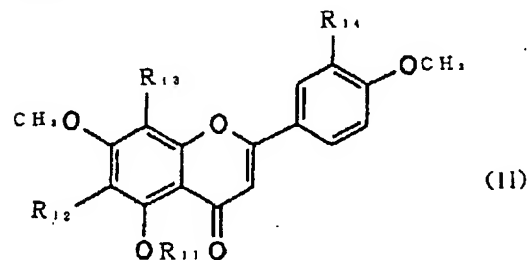
【化3】



【0009】(式中、R₁は水素原子または炭素数1～6の低級アルキル基を表し、R₂、R₃およびR₄は各々独立に水素原子または炭素数1～6のアルコキシ基を表し、R₅は炭素数1～6の低級アルキル基を表す。) 好ましいポリアルコキシフラボノイドはポリメトキシフラボノイドであり、より好ましくは、下記の一般式(II)で表される化合物である。

【0010】

【化4】



【0011】(式中、R₁は水素原子またはメチル基を表し、R₂、R₃およびR₄は各々独立に水素原子またはメトキシ基を表す。) 上記の一般式(II)で表される化合物の一例を以下の表1に示す。

【0012】

【表1】

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
5-デメチルノビレチン	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
タンゲレチン	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
ノビレチン	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
8-デメトキシノビレチン (シネンセチン)	CH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
6-デメトキシタンゲレチン	CH ₃	H	OCH ₃	H
6-デメトキシノビレチン	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃

【0013】これらのメトキシフラボノイドは細胞毒性が低いという利点を有する。フラボノイドは植物界に広く分布している化合物であり、Two new polymethoxylated flavones, a class of compounds with potential anticancer activity, isolated from cold pressed dancy tangerin peel oil solids (Jie Chem et al. J. Agric Food Chem. 1997, 45, 364-368)に記載されているような方法で植物から抽出・分離することができる。

【0014】マトリックスメタロプロテアーゼまたはその前駆体としては、コラゲナーゼ群の酵素(MMP-1, -8および-13)、ゼラチナーゼ群の酵素(MMP-2および-9)、ストロムライシン群の酵素(MMP-3および-10)、膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ群の酵素(MMP-14, -15, -16および-17)、マトリライシン(MMP-7)、メタロエラスターゼ(MMP-12)、およびそれらの前駆体などが挙げられる。本発明の薬剤は、マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患の予防および/または治療薬として利用することができる。マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患としては、慢性関節リウマチ、変形性関節症、がん、動脈硬化症、動脈瘤、肝硬変、潰瘍、骨粗鬆症、肺線維症、糸球体腎炎、歯周炎などが挙げられる。

【0015】本発明の薬剤を医薬品として使用する際には、予防および/または治療上有効な量のフラボノイドが製薬学的に許容できる担体または希釈剤とともに製剤化されるとよい。その他にも、結合剤、吸収促進剤、滑沢剤、乳化剤、界面活性剤、酸化防止剤、防腐剤、着色剤、香料、甘味料などを添加してもよい。このような医薬製剤において、有効成分であるフラボノイドの担体成分に対する割合は、0.1~10重量%であるとよく、好ましくは0.5~1.0重量%である。医薬製剤の剤形としては、顆粒剤、細粒剤、錠剤、カプセル剤、丸剤、軟膏、ゲル、ペースト、クリーム、噴霧剤、溶液剤、懸濁液剤などを挙げることができ、その投与経路としては、経口投与の他、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、関節腔などの非経口投与など種々の投与経路を挙げることができる。

【0016】本発明の医薬品は、有効成分であるフラボノイドの量に換算して、通常、100~1000mgの投与量で、一日1~数回程度投与することができるが、この投与量および投与頻度は、病状、性別、投与経路などに応じて適宜変更されうる。また、本発明の薬剤を食品に添加してもよい。本明細書において、「食品」とは、栄養素を1種以上含む天然物およびその加工品をいい、あら

ゆる飲食物を含む。本発明の薬剤を添加する食品としては、チョコレート、ビスケット類、飴菓子などの菓子類、ジュースなどの清涼飲料、牛乳、ヨーグルトなどの乳酸飲料などを挙げることができる。

【0017】

【実施例】本発明を以下の実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例に限定されることはない。

〔製造例1〕柑橘類の一種であるシイクワシャー (Citrus depressa) の果皮のフラベドの部分を剥皮し、これをアセトン中に液浸し、粗フラボノイド抽出液を得る。これを濃縮乾燥した後、50%メタノールに溶かし、オクタデシルシリカゲルを担体とする逆相系カラム、溶離液としてメタノール-10mMリン酸(4:6→6:4)を用い、紫外線吸収検出器(340nm)でモニターしながら分取を行う。得られた分画を濃縮乾燥することで目的のフラボノイドを得た。

【0018】タンゲレチン:

無色針状結晶(クロロホルム、メタノール混液より再結晶)

mp. 150-151°

EI-MS m/z 372[M]⁺ (C₂₀H₂₀O₇)

IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 2945, 2835, 1645, 1605, 1580, 1510, 1480, 1460, 1420, 1400, 1365, 1305, 1260, 1215, 1175, 1130, 1105, 1065, 1025, 1015, 1000, 965, 945, 935, 890, 825, 795.

UV λ_{max} (EtOH) nm: 322, 272.

¹H-NMR (CDCl₃) δ 7.87(2H, d, J=8.9Hz), 7.02(2H, d, J=8.9Hz), 6.59(1H, s), 4.09(3H, s), 4.02(3H, s), 3.94(3H×2, s), 3.88(3H, s).

¹³C-NMR (CDCl₃) δ 177.3(C=O), 162.3(C), 161.2(C), 151.3(C), 148.4(C), 147.7(C), 144.1(C), 138.1(C), 127.7(CH×2), 123.8(C), 114.9(C), 114.5(CH×2), 106.7(CH), 62.2(OMe), 62.0(OMe), 61.8(OMe), 61.6(OMe), 55.5(OMe).

【0019】ノビレチン:

無色針状結晶(クロロホルム、メタノール混液より再結晶)

mp. 137-138°

EI-MS m/z 402[M]⁺ (C₂₁H₂₂O₈)

IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 2950, 2840, 1640, 1585, 1565, 1510, 1480, 1460, 1415, 1410, 1365, 1335, 1300, 1275, 1255, 1220, 1205, 1170, 1145, 1100, 1075, 1035, 1030, 1015, 965, 950, 905, 860, 835, 810, 800.

UV λ_{max} (EtOH) nm: 331, 271, 250.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.55 (1H, dd, $J=8.5, 2.1\text{Hz}$), 7.39 (1H, d, $J=2.1\text{Hz}$), 6.97 (1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 6.59 (1H, s), 4.08 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.94 (3H, s), 3.93 (3H $\times 2$, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 177.2 (C=O), 160.9 (C), 151.9 (C), 151.3 (C), 149.2 (C), 148.3 (C), 147.6 (C), 144.0 (C), 137.9 (C), 123.9 (C), 119.5 (CH), 114.8 (C), 111.2 (CH), 108.5 (CH), 106.8 (CH), 62.2 (OMe), 61.9 (OMe), 61.7 (OMe), 61.6 (OMe), 56.0 (OMe), 55.9 (OMe).

【0020】5-デメチルノビレチン:

淡黄色粉末

EI-MS m/z 388 $[M]^+$ ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_8$)

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3420, 2945, 2830, 1640, 1610, 1585, 1510, 1480, 1460, 1435, 1430, 1415, 1365, 1340, 1265, 1225, 1190, 1170, 1145, 1115, 1065, 1035, 1030, 1015, 960, 850, 835, 795.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 12.53 (s, OH), 7.58 (1H, dd, $J=8.6, 2.0\text{Hz}$), 7.42 (1H, d, $J=2.0\text{Hz}$), 6.99 (1H, d, $J=8.6\text{Hz}$), 6.60 (1H, s), 4.11 (3H, s), 3.98 (3H $\times 2$, s), 3.96 (3H, s), 3.95 (3H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 182.9 (C=O), 163.9 (C), 153.0 (C), 152.5 (C), 149.5 (C), 149.4 (C), 145.7 (C), 136.6 (C), 132.9 (C), 123.7 (C), 120.1 (CH), 111.3 (C), 108.8 (CH), 107.0 (C), 104.0 (CH), 62.0 (OMe), 61.7 (OMe), 61.1 (OMe), 56.1 (OMe), 56.0 (OMe).

【0021】シネンセチン:

白色粉末

EI-MS m/z 372 $[M]^+$ ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$)

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 2990, 2935, 2820, 1635, 1595, 1505, 1485, 1460, 1445, 1425, 1415, 1345, 1320, 1285, 1265, 1255, 1245, 1215, 1205, 1200, 1165, 1145, 1115, 1095, 1060, 1020, 985, 955, 865, 835, 815, 785, 760.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.50 (1H, dd, $J=8.5, 2.1\text{Hz}$), 7.32 (1H, d, $J=2.1\text{Hz}$), 6.96 (1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 6.79 (1H, s), 6.58 (1H, s), 3.99 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.95 (3H, s), 3.91 (3H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 177.1 (C=O), 161.1 (C), 157.6 (C), 154.5 (C), 152.6 (C), 151.8 (C), 149.3 (C), 140.3 (C), 124.1 (C), 119.6 (CH), 112.9 (C), 111.2 (CH), 108.7 (CH), 107.4 (CH), 96.2 (CH), 62.2 (OMe), 61.5 (OMe), 56.3 (OMe), 56.1 (OMe), 56.0 (OMe).

【0022】6-デメトキシタンゲレチン:

白色粉末

EI-MS m/z 342 $[M]^+$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$)

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3000, 2945, 2845, 1635, 1600, 1570, 1505, 1460, 1420, 1405, 1375, 1340, 1305, 1295, 1255, 1245, 1210, 1185, 1175, 1135, 1110, 1045, 1030, 875, 960, 930, 880, 840, 810, 800.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.87 (2H, d, $J=9.0\text{Hz}$), 7.01 (2H, d, $J=9.0\text{Hz}$), 6.58 (1H, s), 6.43 (1H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.94 (3H, s), 3.87 (3H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 177.8 (C=O), 162.1 (C), 160.6 (C), 156.

4 (C), 156.3 (C), 151.9 (C), 130.8 (C), 127.6 (CH $\times 2$), 123.9 (C), 114.4 (CH $\times 2$), 109.1 (C), 106.9 (CH), 92.6 (CH), 61.5 (OMe), 56.6 (OMe), 56.3 (OMe), 55.4 (OMe).

【0023】6-デメトキシノビレチン:

白色粉末

EI-MS m/z 372 $[M]^+$ ($\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$)

IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 2930, 2845, 1635, 1595, 1575, 1505, 1455, 1435, 1420, 1400, 1375, 1340, 1320, 1295, 1275, 1255, 1230, 1210, 1205, 1170, 1135, 1120, 1105, 1040, 1035, 1015, 965, 945, 855, 835, 800, 795.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 7.58 (1H, dd, $J=8.5, 2.1\text{Hz}$), 7.42 (1H, d, $J=2.1\text{Hz}$), 6.98 (1H, d, $J=8.5\text{Hz}$), 6.61 (1H, s), 6.44 (1H, s), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.95 (3H $\times 2$, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) δ 177.8 (C=O), 160.5 (C), 156.5 (C), 156.3 (C), 151.9 (C), 151.8 (C), 149.3 (C), 130.8 (C), 124.1 (C), 119.5 (CH), 111.2 (CH), 109.1 (C), 108.6 (CH), 107.2 (CH), 92.6 (CH), 61.5 (OMe), 56.6 (OMe), 56.3 (OMe), 56.0 (OMe), 55.9 (OMe).

【0024】〔実施例1〕実験材料および実験方法

1. 培養器具および試薬

細胞培養用プラスチック器具は岩城硝子、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) およびオリゴ (dT) プライマーは Life Technologies, Inc.、 Ca^{2+} および Mg^{2+} 不含リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) は日水製薬、胎仔ウシ血清 (FBS) は M.A. Bioproducts 製、ペニシリン G は万有製薬、硫酸ストレプトマイシンは明治製薬、コラゲナーゼ (Clostridium histolyticum 由来, type I) は Worthington Biochemical Co.、トリプシンは DIFCO Laboratories Co.、ラクトアルブミン水解物 (LAH)、ニトロブルーテトラゾリウム、5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、アルカリホスファターゼ結合ロバ抗 (ヒツジ IgG) IgG およびデキサメタゾン は Sigma、cAMP enzyme immunoassay system は Amersham から各々購入し使用した。

【0025】組換えヒトインターロイキン-1 α (rhIL-1 α , 2×10^7 units/mg) は大日本製薬より、ヒツジ (抗ウサギ proMMP-1) 抗体、ヒツジ (抗ウサギ proMMP-3) 抗体およびヒツジ抗 (ヒト TIMP-1) 抗体はカンサス大学医学部の Hideaki Nagase 教授より提供を受けた。その他の試薬は全て特級試薬を使用した。

【0026】2. ウサギ関節軟骨細胞および滑膜細胞の分離・培養および薬物処理

1) ウサギ関節軟骨細胞の調製及び培養法

ウサギ関節軟骨細胞は、雌性日本白色種ウサギ (3週齢、体重約400g、(株)東京実験動物より入手) の大腿骨より Green らの方法 (Green, W. T. (1971) Clin. Orthop. Rel. Res. 75, 248-260) に従って分離培養した。すなわち、軟骨組織を PBS(-)、Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) および 0.1% (w/v) EDTA/PBS(-) にて順次洗浄後細切し、0.1% (w/v) EDTA/PBS(-) 中で 37°C、20 分間インキュベーションした後上清を除去した。続いて

0.125%(w/v) トリアシン/DMEM 中で37°C、1 時間組織片を攪拌しながら消化し上清を除去した後、さらに0.1%(w/v) コラゲナーゼ/DMEM10%(v/v)FBS中で37°C、2 時間攪拌しながら消化し、この細胞懸濁液を4°C、700 ×gで10分間遠心分離し軟骨細胞を得た。

【0027】細胞をPBS(-)で洗浄し、再び4°C、700 ×gで10分間遠心分離後10%(v/v)FBS/DMEMに懸濁しナイロンメッシュ(150メッシュ)でろ過し、細胞数を調整して5% CO₂-95% air気相下、37°Cにて培養した。実験には初代培養および継代数1の細胞を使用した。滑膜細胞については、日本白色種ウサギの膝関節より滑膜を摘出し、10mm皿に接着させ10%(v/v)FBS/DMEM中で5% CO₂-95% air気相下、37°Cにて培養した後、組織よりout growthしたものをを用いた。なお、実験には継代数が4~6のものをを用いた。また、上記で用いた試薬には全てペニシリンG(200 units/ml)および硫酸ストレプトマイシン(200 μg/ml)を添加して使用した。

【0028】2) ウサギ軟骨細胞および滑膜細胞の薬物処理方法

ウサギ軟骨細胞および滑膜細胞を24-ウェルプレートに播種し、10%(v/v)FBS/DMEM中でコンフルエントまで培養した。この細胞を0.2%(w/v)LAH/DMEMで洗浄後、薬物処理を施した。なお各種フラボノイドはジメチルスルホキシド(DMSO)溶液としてDMSOの終濃度が0.6~0.25%(v/v)になるように添加した。続いて5% CO₂-95%air気相下に37°Cで24時間インキュベーション後、培養液を回収し実験に供するまで-20°Cで保存した。

【0029】3. ウェスタンブロット法

培養液に20%(w/v)トリクロロ酢酸(TCA)溶液を終濃度3.3%(w/v)となるよう加え4°Cで12時間以上保存した後、8.000×gで5分間遠心分離した。得られた沈殿をエーテルで1回洗浄後エーテルを除去しLaemmliの方法(Laemmli, U. K. (1970) Nature 227, 680-685)に従って調製した試料溶液に溶解した。続いて還元条件下にてSDS-PAGEを行い、ゲルを転写用緩衝液(20mM Tris/150 mM グリシン/20% (w/v)メタノール/0.1%(w/v)SDS(pH9.2))に浸したニトロセルロース膜に密着させセミドライ型転写装置を用い200mAで1時間転写した。転写後ニトロセルロース膜をドライミルク溶液(10%(w/v) 脂肪不含ドライ ミルク/10 mM Tris-HCl/0.9%(w/v)NaCl/0.02%(w/v)NaN₃ (pH7.5))に浸し10分間のブロッキングを行い、続いてイオン交換水およびTBS緩衝液(50mM Tris-HCl/200mM NaCl(pH7.5))にて数回洗浄し1%(w/v)BSA/PBS(-)で希釈したウサギproMMP-1およびproMMP-3に対する1次抗体溶液に4°Cで12時間以上浸した。1次抗体結合後ブロッキングおよび洗浄を同様に行い、アルカリホスファターゼ標識の2次抗体の溶液に室温で1時間浸した後TBS緩衝液にて数回洗浄した。このニトロセルロース膜を基質溶液(0.4mM ニトロブルー-テトラゾリウム/0.4 mM 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルホスフェート/10mM Tris-HCl/100 mM NaCl

/5mM MgCl₂ (pH8.0))に浸し適当な時間発色させた後、イオン交換水にて洗浄しStop solution (20mM Tris-HCl/5 mM EDTA(pH8.0))にて発色を停止した。

【0030】4. 細胞内cAMP量の測定

ウサギ滑膜細胞に薬物を添加し、10分後に培養液を回収した。次いで氷冷したPBS(-)にて細胞を洗浄し、さらに氷冷した7%(w/v)TCAを加え、ただちにラバーポリスマンで細胞を剥離し超音波破碎(200w, 6秒間に3回)を施した。TCAによる抽出を完全にするために細胞破碎物の懸濁液を凍結、融解した後、4°C、1300 ×gにて5分間遠心分離し、その上清をエーテルで2回洗浄したものをサンプルとした。サンプル中のcAMP量はcAMP enzyme immunoassay systemを用い、添付の操作法に従って測定した。サンプル1mlにアセチル化試薬25 μlを加え、cAMPをアセチル化した。この試料50 μlに抗cAMPウサギ血清100 μlを加え、4°Cで2時間インキュベーションした。次いで、ペルオキシダーゼ標識cAMP溶液を100 μlを加え、4°Cで1時間インキュベーションした。抗体に結合しなかったペルオキシダーゼ標識cAMPおよびcAMPを洗浄液にて4回洗浄した。さらに基質溶液を150 μl加え、室温で振とうしながら1時間発色させた後、1M硫酸で発色を停止し、450nmで吸光度を測定した。cAMP量は同様に作成した標準曲線から算出した。

【0031】5. ゼラチンゼイモグラフィ法

回収した培養液(15 μl)に試料溶液 (5 μl)を添加しサンプルとした。そのうち15 μlについてゼラチン(0.6mg/ml)を含む10%(w/v)アクリルアミドゲルを用いてSDS-PAGEを行った。その後、ゲル中からSDSを除くため2.5%(w/v)Triton X-100を含むインキュベーション緩衝液(50mM Tris-HCl(pH7.5)/5 mM CaCl₂/1 mM ZnCl₂/0.02%(w/v)NaN₃)で1時間室温にて振とした。ついで同緩衝液中で37°Cにて1.5時間インキュベーションした後、ゲルを染色液(0.1%(w/v)クーマシーブリリアントブルー/50%(v/v)メタノール/20%(v/v)酢酸)中で適当な時間染色した。その後、脱色液(30%(v/v)メタノール/1%(v/v)蟻酸)中で適当な時間脱色を行い、青い背景に対してゼラチン分解活性のある部分を透明なバンドとして検出した。

【0032】6. ノーザンブロット法

ノビレチンによるproMMP産生の抑制が対応するmRNAの変動を伴ったものであるか否かをノーザンブロット法にて検討した。

1) 総RNAの抽出

細胞からの総RNAの抽出はChomczynskiおよびSacchiの方法(Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Anal. Biochem, 162, 156-159)に従い、ISOGENを用いて行った。

【0033】細胞を60または100mm dishにて10%(v/v)FBS/DMEMでconfluentまで培養し、serum-freeの条件下で熱ショックおよび薬物処理を施した。培養液を完全に回収後、1 mlのISOGENを加え細胞を溶解した。細胞溶解液をラバーポリスマンで集めて0.2mlのCHCl₃を加え激しく

振とうし、室温にて5分間放置した後、4℃、12,000xgで15分間遠心分離した。水層(上層)を新しいチューブに写し、同量の2-propanolを加えて振とうした後、室温にて10分間放置し同様に遠心分離した。上清を除去し得た総RNA沈殿を75%(v/v) EtOHで洗浄後、RNase-free滅菌精製水に溶解し-80℃にて保存した。

【0034】2) Northern blotting法

総RNA(10μg)をdenaturing solution(56%(v/v)formamide/22%(v/v)formaldehyde/0.1mM ethidium bromide/MOPS buffer(20 mM MOPS/1 mM EDTA/1 mM AcONa))を加えて65℃、15分間熱変性後、氷冷し10 x dye mix loading buffer(0.2%(w/v)bromophenol blue/10 mM EDTA/50%(v/v) glycerol)を加えてサンプルした。サンプルをMOPS bufferおよび6.6%(v/v)formaldehydeを含んだ1%(w/v)アガロースゲルにて電動泳動した後、10 x SSC(1 x SSC; 0.15 M NaCl/0.015 M クエン酸ナトリウム(pH 7.0))中でナイロンメンブラン(DUPONT社製)に転写し、さらにFuna-UV-Linker(フナコシ社製)を用いUV照射によりRNAを固定した。この際RNAが無傷であることをエチジウムブロマイドの染色パターンにて確認した。

【0035】3) ランダムプライマー法およびハイブリダイゼーション法

メンブランはランダムプライマー法により合成した^[32P] 標識DNAを用いてハイブリダイゼーションを行った。つまりメンブランをhybridization buffer(50%(v/v)formamide/5 x SSC/0.1%(w/v)SDS/1 x Denhardt's solution/0.02 M リン酸ナトリウム/0.02%(w/v)denatured salmon sperm DNA)中で42℃、2時間プレハイブリダイゼーションを行った後、^[32P] 標識DNAを含むhybridization buffer中で42℃、over nightでハイブリダイゼーションを実施した。ハイブリダイゼーション終了後、メンブランを1 x SSC/0.1%(w/v)SDSおよび0.1 x SSC/0.1%(w/v)SDSで適当な時間洗浄した。その後、メンブランを乾燥させて-80℃でX-ray film(コニカ社製)に適当な時間露光した。

【0036】7. タンパク質合成活性の測定

Confluentのウサギ関節滑膜細胞(24-multiwell plate)を37℃または42℃で一定時間培養後、培養液を^[3H]-amino acids mixture(1 μCi/ml)を含む1 mlの0.2%(w/v)LAH/MEM/non A.A. に交換し、37℃で2時間インキュベーションした。インキュベーション終了後、培養液をただちに回収し、0.2mlの冷60%(w/v)TCAを加え4℃でover nightで放置し、10,000 x gで10分間遠心分離した後、沈澱を1 mlの10%(w/v)TCAで3回洗浄した(medium画分)。一方、細胞は冷PBS(-)で3回洗浄し、10%(w/v)TCAを0.5ml添加し30分間放置した後、0.5mlのエタノール:エーテル(3:1)溶液で1回洗浄し、over nightで風乾した(cell画分)。Medium画分およびcell画分ともに0.5mlの0.5N NaOHに溶解した後、放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0037】8. プロスタグランジンE産生に対する作用の測定法

慢性関節リウマチ病巣では、MMPの増加に加えて、滑膜細胞を産生源とする、炎症メディエーターであるPGE₂産生の亢進が報告されている。そこで、ノビレチンのPGE₂産生に対する作用を以下のような方法で検討した。PentlandとNeedlemanの方法(Pentland, A. P. and Needleman, P. (1986) J.Clin. Invest. 77, 246-251)に従った。すなわち、回収した培養液50 μlおよびPGE₂標準液50 μl(3.125~200pg)に^[3H] PGE₂溶液50 μl(1.44 MBq)およびPGE₂抗血清60 μlを加え混和後、4℃で18時間反応させた。抗体に結合しなかった遊離の^[3H] PGE₂をdextranで被覆したcharcoal溶液(0.025%(w/v)dextran/0.25%(w/v)charcoal/0.9%(w/v)NaCl)500 μlに吸着させ、4℃、1,600×gで15分間遠心分離後、上清500 μlの放射活性を液体シンチレーションカウンター(Aloka LSC-1000, LSC-3500)で測定した。

【0038】9. 滑膜細胞の増殖への影響の測定法

慢性関節リウマチの特徴のひとつに関節滑膜の異常増殖に起因するパヌス形成がある。そこで、滑膜細胞の増殖に対するノビレチンの作用を検討した。細胞増殖能の測定は、Ahmedら(Ahmed, S. A, Gogal, R. M. and Walsh, J. E.J. Immunol. Methods. (1994) 170, 211-224)の方法(alamar Blue assay)によりcell counting kit(DOJINDO製)を用い、添付の操作方法に従って測定した。すなわち、ウサギ滑膜細胞を96-well plateに細胞数1×10⁴ cells/mlで播種し、5% CO₂-95% air気相下、37℃で2時間培養後、薬物処理を10%(v/v)FBS/DMEMにて施し、48時間後にalamar Blue試薬を加え、4時間発色後570nmで吸光度を測定した。

【0039】実験結果および考察

1. ウサギ関節滑膜細胞および関節軟骨のマトリックスメタロプロテアーゼ産生に対するフラボノイド類の影響(ゼラチンザイモグラフィ、図1および2)

6種のフラボノイド類(5-デメチルノビレチン、タンゲレチン、ノビレチン、8-デメトキシノビレチン(シネンセチン)、6-デメトキシタンゲレチンおよび6-デメトキシノビレチン)についてproMMP-2(ゼラチナーゼA)産生に及ぼす作用を検討した(図1)。ProMMP-2は、細胞培養系において無刺激下に産生される事が知られているものであり、一方proMMP-9はインターロイキン1や腫瘍壊死因子αなどの炎症性サイトカインの刺激により誘導されるものである。図1のレーン1はコントロール、レーン2は0.64%DMSO、レーン3はIL-1α(1 ng/ml)、レーン4はIL-1α+0.64%DMSO、レーン5および6はIL-1α+5-デメチルノビレチン(32および64 μM)、レーン7および8はIL-1α+タンゲレチン(32 および64 μM)、レーン9および10はIL-1α+ノビレチン(32 および64 μM)、レーン11はデキサメタゾン(2 μM)、レーン12および13はIL-1α+シネンセチン(32 および64 μM)、レーン

14および15はIL-1 α +6-デメトキシタンゲレン(32 および64 μ M)、レーン16および17はIL-1 α +6-デメトキシノビレチン(32 および64 μ M)を示す。図1に示すように、タンゲレン、ノビレチンおよびシネンセチンが濃度依存的にIL-1 α により誘導したproMMP-9産生を強く抑制した。なかでもノビレチンの作用は顕著であり、その作用はMMP産生に対して強い抑制作用を示すことで知られるデキサメタゾンのそれとほぼ同様であった。一方、恒常的に産生されるproMMP-2の産生は、全く影響を受けなかった。

【0040】さらに、ウサギ軟骨細胞においても同様に検討した(図2)。図2のレーン1はコントロール、レーン2は0.64%DMSO、レーン3はIL-1 α (1 ng/ml)、レーン4はIL-1 α +0.64%DMSO、レーン5および6はIL-1 α +5-デメチルノビレチン(32 および64 μ M)、レーン7および8はIL-1 α +タンゲレン(32 および64 μ M)、レーン9および10はIL-1 α +ノビレチン(32 および64 μ M)、レーン11はデキサメタゾン(2 μ M)、レーン12および13はIL-1 α +シネンセチン(32 および64 μ M)、レーン14および15はIL-1 α +6-デメトキシタンゲレン(32 および64 μ M)、レーン16および17はIL-1 α +6-デメトキシノビレチン(32 および64 μ M)を示す。図2に示すようにタンゲレン、ノビレチンおよびシネンセチンに加えて5-デメチルノビレチンが濃度依存的なproMMP-9産生抑制作用を示した。一方、proMMP-2の産生は、全く影響を受けなかった。

【0041】これらの実験系では、5-デメチルノビレチンと6-デメトキシノビレチンは培養中に結晶として析出が観察され、真の用量依存性を観察することができない可能性がある、しかし、これも溶解度の特性とすればそれぞれの薬物の作用特性とも言える。以下、proMMP-9産生抑制作用の顕著であったノビレチンについて詳細な検討結果を記載する。

【0042】2. ウサギ関節滑膜細胞のproMMP産生に対するノビレチンの作用(ウエスタンブロット法、図3) 図3において、レーン1は0.2%DMSO、レーン2はコントロール、レーン3~5はノビレチン(それぞれ、16、32 および64 μ M)、レーン6はIL-1 α (1 ng/ml)+0.2%DMSO、レーン7はIL-1 α 、レーン8~12はIL-1 α +ノビレチン(それぞれ、4、8、16、32および64 μ M)およびレーン13はIL-1 α +デキサメタゾン(2 μ M)を示す。パネルAはproMMPs-2 および-9、パネルBはproMMP-1/コラゲナーゼ、パネルCはproMMP-3/ストロムライシン1に対するものである。図3に示すように、ノビレチンはウサギ関節滑膜細胞においてIL-1 α により誘導したproMMP-9、proMMP-1(プロコラゲナーゼ)およびproMMP-3(プロストロムライシン1)産生を濃度依存的(4~64 μ M)に抑制した。

【0043】3. ウサギ関節軟骨細胞の細胞内cAMPにおよぼすノビレチンの影響(図4)

ノビレチンはホスフォジエステラーゼ阻害作用を有することが知られていることから、当該試験薬の細胞内cAMPにおよぼす作用を検討した。図4において、縦軸はcAMPの産生量を表し、横軸の1はコントロール、2~4はノビレチン(それぞれ、3.2、32および100 μ M)、および5はプロスタグランジン E1(1 ng/ml)を示す。図4に示すように、ウサギ関節軟骨細胞にノビレチンを添加し10分後の細胞内cAMPを測定すると高濃度(32 μ M<)において明らかなcAMPの増加が観察された。ノビレチンは従来in vitro系においてアデニル酸シクラーゼを直接阻害することが知られているが、上記の実験結果はノビレチンが細胞膜を透過して細胞内アデニル酸シクラーゼを直接に抑制することも示している。一般にcAMPはMMP産生に対して抑制的に作用することが知られており、上述したノビレチンのproMMPs産生抑制作用が細胞内cAMP増加作用に起因したものであるか否かについても興味をもたれる。

【0044】以上に示したようにノビレチンをはじめとする幾つかのフラボノイドには関節滑膜細胞や関節軟骨細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ産生を濃度依存的に抑制することが判明した。当該酵素はOAやRAにおける軟骨基質の破壊と密接に関連しており、上記のフラボノイドが関節破壊防御薬として有効であることを示していると言える。さらに、MMPはがん細胞の移転・浸潤とも密接に関わっており、上記のフラボノイドはがん細胞へも有効に作用すると考えられる。

【0045】4. ウサギ関節滑膜細胞のproMMP産生に対するノビレチンの作用(ノーザンブロット法、図5) 図5に示すように、ノビレチンはほぼ濃度依存的にproMMP-1およびproMMP-3 mRNAの発現を抑制し、先の実験におけるノビレチンによる酵素タンパク質の減少はそれぞれのmRNA発現の抑制に起因するものであることが示された。また、このノビレチンのMMP産生抑制作用は、関節滑膜と隣接する関節軟骨細胞においても同様に観察された。

【0046】5. [3 H]アミノ酸混合物の取り込み(図6) 図6に示すように、ノビレチンは無刺激の細胞への[3 H]アミノ酸混合物取り込みにより検討したタンパク質合成に対して抑制傾向を示したが、IL-1 α にて刺激した細胞ではこの抑制傾向もほとんど認められなかった。この事実、上記の実験で示したノビレチンのproMMP産生抑制作用が当該酵素産生に特異的であることを示している。図6中、*、**および***は、それぞれ、 $P < 0.05$ 、 0.01 および 0.001 で、コントロールの細胞と有意差があることを示している。

【0047】6. プロスタグランジンE産生に対する作用(図7)

図7に示すように、ノビレチンはMMP産生抑制を示す濃度よりも極めて低い濃度においてもIL-1 α が誘導したPG

E_2 産生をほぼ完全に抑制した。図7中、***は、 $P < 0.001$ で、コントロールの細胞と有意差があることを示しており、###は、 $P < 0.001$ で、 $IL-1\alpha$ 処理細胞と有意差があることを示している。

【0048】7. 滑膜細胞の増殖への影響 (図8)

図8に示すように、ノビレチンは、増殖期のウサギ滑膜細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。図6中、**は、 $P < 0.01$ で、コントロールの細胞と有意差があることを示しており、##および###は、 $P < 0.01$ および 0.001 で、 $IL-1\alpha$ 処理細胞と有意差があることを示している。以上、ノビレチンはウサギ関節滑膜細胞において、proMMP産生を抑制するのみならず、炎症メディエーターである PGE_2 産生をも抑制した。さらに、パヌス形成とも関連する滑膜細胞の増殖抑制作用も有することが確認された。これらの事実は、関節破壊保護物質としてノビレチンが有効であることを示している。

【0049】

【発明の効果】フラボノイドを利用することにより、マトリックスメタロプロテアーゼまたはその前駆体の産生を阻害することができる。従って、フラボノイドを投与することにより、マトリックスメタロプロテアーゼ関連

疾患を予防および/または治療することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ウサギ関節滑膜細胞のproMMP-2およびproMMP-9産生におよぼすフラボノイドの影響を示す。

【図2】図2は、ウサギ関節軟骨細胞のproMMP-2およびproMMP-9産生におよぼすフラボノイドの影響を示す。

【図3】図3は、ウサギ関節滑膜細胞のproMMP産生におよぼすノビレチン濃度の影響を示す。

【図4】図4は、ウサギ関節軟骨細胞の3', 5'-cyclic AMP産生におよぼすノビレチンの影響を示す。

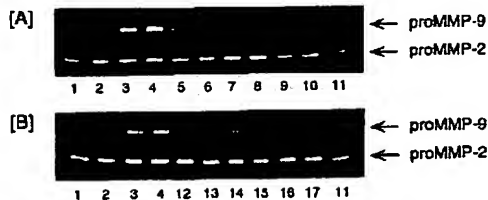
【図5】図5は、ウサギ関節滑膜細胞のproMMP-1およびproMMP-3の定常状態mRNAレベルにおよぼすノビレチンの影響を示す。

【図6】図6は、ウサギ関節滑膜細胞の $[^3H]$ アミノ酸混合物取り込みにおよぼすノビレチンの影響を示す。

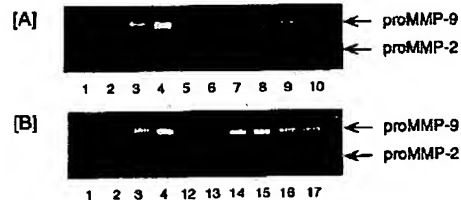
【図7】図7は、ウサギ関節滑膜細胞の PGE_2 産生におよぼすノビレチンの影響を示す。

【図8】図8は、 $IL-1\alpha$ 、ノビレチン、インドメタシンおよびデキサメタゾンで処理したウサギ関節滑膜細胞の増殖を示す。

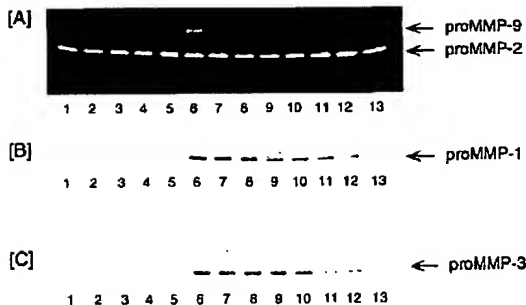
【図1】



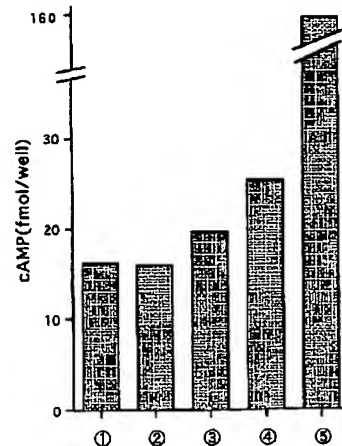
【図2】



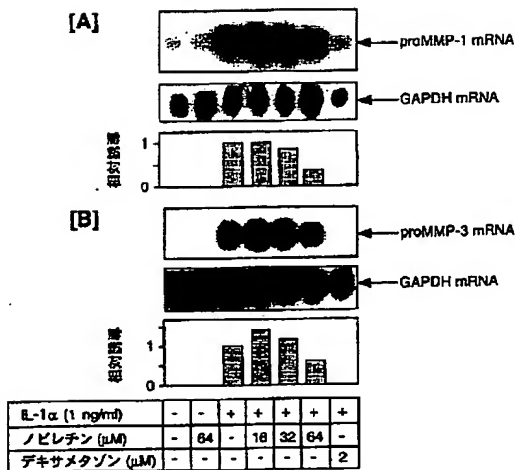
【図3】



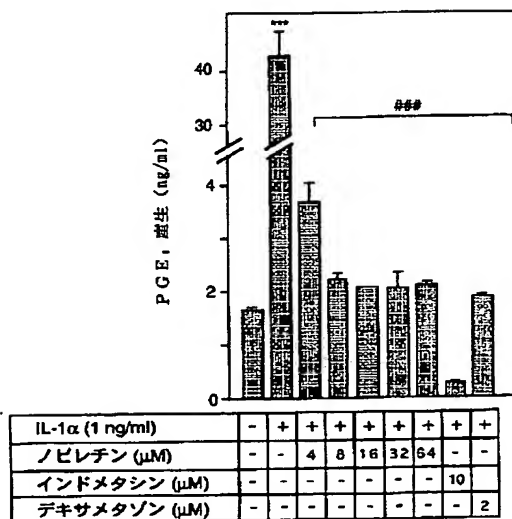
【図4】



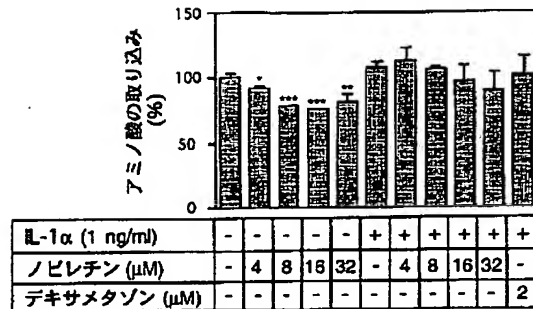
【図5】



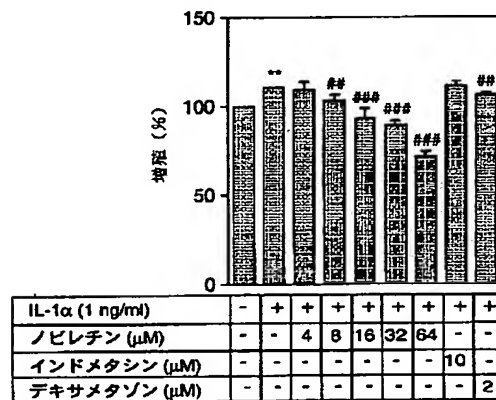
【図7】



【図6】



【図8】



【手続補正書】

【提出日】平成11年7月13日(1999. 7. 13)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

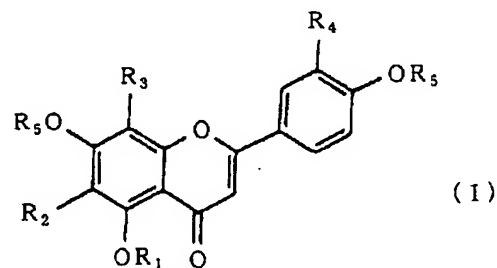
【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の一般式(1)で表されるポリアルコキシフラボノイドを含有する、マトリックスメタロプロテアーゼまたはその前駆体の産生を阻害するための薬

剤。

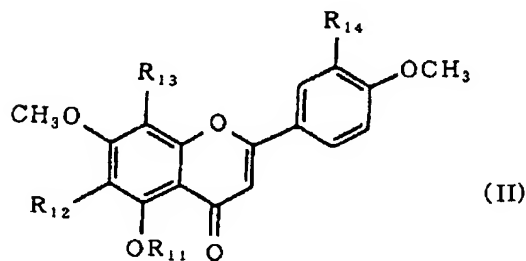
【化1】



(式中、R₁は水素原子または炭素数1～6の低級アルキル基を表し、R₂、R₃およびR₄は各々独立に水素原子または炭素数1～6のアルコキシ基を表し、R₅は炭素数1～6の低級アルキル基を表す。)

【請求項2】 ポリアルコキシフラボノイドが下記的一般式(II)で表されるポリメトキシフラボノイドである請求項1記載の薬剤。

【化2】



(式中、R₁₁は水素原子またはメチル基を表し、R₁₂、R₁₃およびR₁₄は各々独立に水素原子またはメトキシ基を表す。)

【請求項3】 一般式(I)で表される化合物が、5-デメチルノビレチン、タンゲレチン、ノビレチン、8-デメトキシノビレチン、6-デメトキシタンゲレチンおよび6-デメトキシノビレチンからなる群より選択される請求項1記載の薬剤。

【請求項4】 マトリックスメタロプロテアーゼまたはその前駆体が、コラゲナーゼ群の酵素、ゼラチナーゼ群の酵素、ストロムライシン群の酵素、膜結合型マトリックスメタロプロテアーゼ群の酵素、マトリライシン、メタロエラスターゼ、およびそれらの前駆体からなる群より選択される請求項1記載の薬剤。

【請求項5】 マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患の予防および/または治療薬として使用する請求項1記載の薬剤。

【請求項6】 マトリックスメタロプロテアーゼ関連疾患が、慢性関節リウマチ、変形性関節症、がん、動脈硬化症、動脈瘤、肝硬変、潰瘍、骨粗鬆症、肺線維症、糸球体腎炎、および歯周炎からなる群より選択される請求項5記載の薬剤。

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

A 6 1 K 31/35

識別記号

ACK

ACL

ACS

ACV

ADT

ADU

A 2 3 L 1/30

A 6 1 K 35/78

// C 0 7 D 311/30

311/32

F I

A 6 1 K 31/35

ACK

ACL

ACS

ACV

ADT

ADU

A 2 3 L 1/30

Z

B

A 6 1 K 35/78

K

C 0 7 D 311/30

311/32

フーワード(参考)

(72)発明者 野々村 睦子

静岡県三島市谷田桜ヶ丘2525

(72)発明者 石和 淳

東京都八王子市堀之内1432-1 東京薬科大学 薬学部内

(72)発明者 佐藤 隆

東京都八王子市堀之内1432-1 東京薬科大学 薬学部内

(72)発明者 三巻 祥浩

東京都八王子市堀之内1432-1 東京薬科大学 薬学部内

(72)発明者 指田 豊

東京都八王子市堀之内1432-1 東京薬科大学 薬学部内

(72)発明者 伊東 晃

東京都八王子市堀之内1432-1 東京薬科大学 薬学部内

Fターム(参考) 4B018 LB01 LB08 MD07 MD48 ME10
ME14 MF01 MF06
4C062 EE56
4C086 AA01 AA02 BA08 GA17 MA01
MA04 NA14 ZA45 ZA59 ZA66
ZA67 ZA75 ZA81 ZA96 ZA97
ZB15 ZB26 ZC20
4C088 AB62 AC04 BA08 BA14 BA21
BA23 BA31 MA01 MA52 NA14
ZA45 ZA59 ZA66 ZA67 ZA75
ZA96 ZA97 ZB15 ZB26 ZC20

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.